

青蒿中一个新的裂环阿摩芬烷型倍半萜

邹道增, 许福洁, 袁继巧, 王满元*

(首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

摘要: 采用硅胶、MCI Gel CHP-20、Sephadex LH-20、ODS 等色谱填料, 运用柱色谱、半制备液相色谱等分离技术, 对青蒿石油醚提取物的中性部位进行分离纯化, 通过高分辨质谱、核磁共振等波谱技术鉴定化合物的结构。从青蒿中分离鉴定了 4 个萜类化合物, 分别鉴定为 (1*S*,4*S*,5*R*,6*S*,9*R*,10*R*)-4-ethoxy-9,10-dimethyloctahydrofuro-(3,2-*i*)-isochromen-11(4*H*)-one (**1**)、3*a*,4,5,6,6*a*,7-hexahydro-3,6-dimethyl-9-methyl-2*H*-naphtho[8*a*,1-*b*]furan-2,8(3*H*)-dione (**2**)、kobusone (**3**) 和 1,2-campholide (**4**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 利用 X-ray 单晶衍射技术确定其绝对构型。化合物 **2** 为新天然产物, 化合物 **3** 和 **4** 为首次从蒿属植物中分离得到。

关键词: 青蒿; 化学成分; 裂环阿摩芬烷型倍半萜; 新天然产物

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)05-1490-04

A new *seco*-amorphane-type sesquiterpenoid from *Artemisia annua* L.

ZOU Dao-zeng, XU Fu-jie, YUAN Ji-qiao, WANG Man-yuan*

(School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Four terpenoids were isolated from the neutral portion of petroleum ether extract of *Artemisia annua* by several chromatographic methods, such as silica gel, MCI Gel CHP-20, ODS, Sephadex LH-20 and semi-preparative HPLC. Their structures were identified by HR-MS and nuclear magnetic resonance spectroscopy. These compounds were defined as (1*S*,4*S*,5*R*,6*S*,9*R*,10*R*)-4-ethoxy-9,10-dimethyloctahydrofuro-(3,2-*i*)-isochromen-11(4*H*)-one (**1**), 3*a*,4,5,6,6*a*,7-hexahydro-3,6-dimethyl-9-methyl-2*H*-naphtho[8*a*,1-*b*]furan-2,8(3*H*)-dione (**2**), kobusone (**3**) and 1,2-campholide (**4**). Compound **1** is a new compound, of which the absolute configuration was established by single crystal X-ray crystallographic analysis. Compound **2** is a new natural product. Compounds **3** and **4** are first isolated from the *Artemisia* genus.

Key words: *Artemisia annua* L.; chemical constituent; *seco*-amorphane-type sesquiterpenoid; new natural product

青蒿为菊科植物黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 的干燥地上部分, 全国大部分地区均产。青蒿味辛、苦, 性寒, 气芳香特异。主入肝、胆经, 清虚热, 擅截疟。以青蒿素为代表的倍半萜类化合物是中药青蒿物质基础研究中最具活力的领域, 几十年来各国科学家对其进行

了大量研究, 迄今发表的青蒿倍半萜类化合物已达 190 多个^[1-8]。

20 世纪 80 年代, 我国优质青蒿资源中青蒿素的含量尚不足 1%^[9,10]。40 余年后, 经过种植领域工作者的不断努力, 我国的优质青蒿资源中青蒿素的含量已达 2% 左右^[11-13], 二氢青蒿酸、青蒿丙素等其他倍半萜类化合物的含量也有提高。由此提示, 与野生资源相比, 人工种植的优质青蒿资源中的倍半萜类次生代谢产物可能已发生较为普遍的量变或质变。

收稿日期: 2024-12-15; 修回日期: 2025-01-17.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81841001); “重大新药创制”科技重大专项资助 (2017ZX09101002-001-002).

*通讯作者 Tel: 86-10-83916548, E-mail: wangmy@ccmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1247

在青蒿素的发明过程中,屠呦呦科研组在海南昌江疫区与原解放军第302医院开展了青蒿中性部分胶囊(简称“醚中干”)对30例疟疾临床患者的疗效观察试验。结果表明,“醚中干”能使患者退烧,大幅度杀灭疟原虫至转阴,疗效优于氯喹。青蒿素是中药青蒿中目前唯一已知的抗疟活性成分。“醚中干”中青蒿素含量非常低,远未达到抗疟有效剂量,却产生了良好的抗疟作用,体现了多组分体系的疗效优势。课题组前期^[13]采用优质青蒿资源开展的多组分抗疟研究提示,青蒿中的倍半萜类化合物具有抗耐药及抗疟增效协同作用。

为了进一步探索青蒿抗疟多组分体系的化学成分,本实验从青蒿石油醚提取物的中性部位分离得到4个萜类化合物,分别为(1*S*,4*S*,5*R*,6*S*,9*R*,10*R*)-4-ethoxy-9,10-dimethyloctahydrofuro-(3,2-*i*)-isochromen-11(4*H*)-one (1)、3*a*,4,5,6,6*a*,7-hexahydro-3,6-dimethyl-9-methyl-2*H*-naphtho[8*a*,1-*b*]furan-2,8(3*H*)-dione (2)、kobusone (3)和1,2-campholide (4)。其中化合物1为新化合物,化合物2为新天然产物,结构见图1。化合物3和4首次从该属植物分离得到。

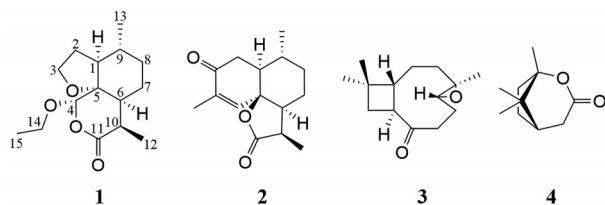


Figure 1 Chemical structures of compounds 1-4

结果与讨论

化合物1 无色块状结晶(二氯甲烷-正己烷)。通过HR-ESI-MS的准分子离子峰 m/z : 269.176 2 [$M+H$]⁺(计算值 269.175 3, C₁₅H₂₅O₄)确定其分子式为C₁₅H₂₄O₄, 不饱和度为4。在化合物1的¹H NMR谱中显示了3个甲基氢信号 [δ_{H} 1.18 (3H, d, J = 7.3 Hz, H-12), 1.01 (3H, d, J = 6.3 Hz, H-13), 1.27 (3H, t, J = 7.1 Hz, H-15)]。

¹³C NMR谱和DEPT谱(表1)显示化合物1共有15个碳信号,可归属为3个甲基碳信号(δ_{C} 12.6, 15.2, 20.6)、5个亚甲基碳信号[含2个连氧亚甲基(δ_{C} 66.0, 69.5)和3个脂肪族亚甲基信号(δ_{C} 24.4, 27.8, 34.8)]、4个次甲基碳信号(δ_{C} 31.4, 35.3, 46.9, 55.3)、1个连氧叔碳信号(δ_{C} 103.7)、1个季碳信号(δ_{C} 79.7)和1个羰基碳信号(δ_{C} 173.0)。化合物1的上述数据与arteannuin G的NMR数据^[14]非常相似,两个化合物的主要区别在于化合物1中C-4位连接的基团由乙酰基变为乙氧基。在HMBC谱(图2)中,C-14(-OCH₂-)氢质子与C-4/C-

15, H-4与C-5/C-11/C-14以及C-15(-CH₃)氢质子与C-14的氢-碳远程相关信号进一步证实了C-4连接的乙氧基存在。在¹H-¹H COSY谱(图2)也观察到H-1/H₂-2/H₂-3、H-6/H₂-7/H₂-8/H-9/Me-13和H₂-14/Me-15的相关信号。综上确定了化合物1的平面结构。

通过铜靶X-ray单晶衍射实验进一步确定(CCDC: 2410356)化合物1的绝对构型为1*S*,4*S*,5*R*,6*S*,9*R*,10*R*。因此,化合物1的结构鉴定为(1*S*,4*S*,5*R*,6*S*,9*R*,10*R*)-4-ethoxy-9,10-dimethyloctahydrofuro-(3,2-*i*)-isochromen-11(4*H*)-one。

Table 1 ¹H (500 MHz) and ¹³C (125 MHz) NMR data of compound 1 (CDCl₃)

No.	$\delta_{\text{H, mult.}}$ (J in Hz)	δ_{C} , type
1	1.42 (ddd, 13.2, 12.0, 7.2)	55.3, CH
2	1.95 (m)	27.8, CH ₂
3	3.89 (dt, 8.8, 7.3), 4.21 (ddd, 9.4, 7.6, 1.9)	69.5, CH ₂
4	5.37 (s)	103.7, CH
5		79.7, C
6	1.81 (m)	46.9, CH
7	1.07 (m), 1.95 (m)	24.4, CH ₂
8	1.09 (m), 1.96 (m)	34.8, CH ₂
9	1.66 (m)	31.4, CH
10	3.13 (qd, 7.2, 4.6)	35.3, CH
11		173.0, C
12	1.18 (d, 7.3)	12.6, CH ₃
13	1.01 (d, 6.3)	20.6, CH ₃
14	3.59 (dq, 9.4, 7.0), 4.09 (dq, 9.5, 7.1)	66.0, CH ₂
15	1.27 (t, 7.1)	15.2, CH ₃

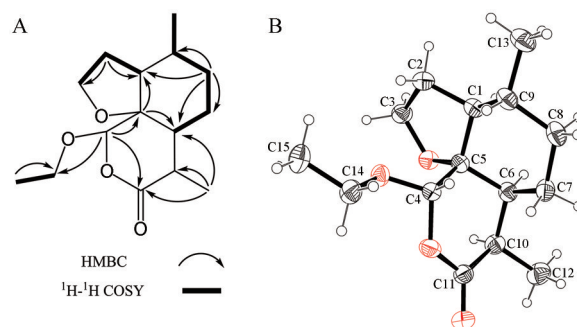


Figure 2 Key HMBC, ¹H-¹H COSY correlations (A) and ORTEP drawing (B) of compound 1

讨论

青蒿中倍半萜化合物以十氢化萘型双环倍半萜(7-异丙基-4,10-二甲基双环[4.0.4]癸烷)最为常见,该类化合物根据两个环的联合方式可分为杜松烷类(cadinanes)、木蓼烷类(muurolanes)、阿摩芬烷类(amorphanes)和布尔加烷类(bulgaranes)4种类型(图3)。由于早期发表文献中多数未提供化合物的X单晶衍射数据,导致这4类化合物的命名与立体结构有较多不一致的地方。在此基础上,裂环(*seco*)、去甲基

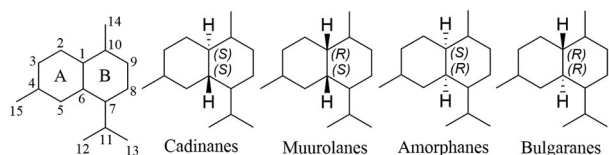


Figure 3 Schematic diagram of decalin-type bicyclic sesquiterpenes in *Artemisia annua*

(*nor*) 以及氧化重排 (*abeo*) 等情况又进一步丰富了青蒿中此类倍半萜的结构类型。

本研究对化合物 **1** 进行了 X 单晶衍射实验研究, 明确其绝对构型为 1*S*, 4*S*, 5*R*, 6*S*, 9*R*, 10*R*, 可为后续深入研究 *seco*-amorphanes 类化合物提供借鉴。

实验部分

AVANCE-II 500MHz 核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司); SYNAPT G2 超高效液相色谱-四极杆飞行时间高分辨质谱联用仪 (美国 ABSCIEX 公司); Thermo Nicolet IS5 红外光谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司); UV-2600 紫外分光光度计、LC-20A 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); Rudolph AP-IV 型旋光仪 (美国 Rudolph 公司); EYELA 旋转蒸发仪 (东京理化器械株式会社); SQP 型分析天平 (赛多利斯科学仪器北京有限公司); ODS-C₁₈ (40~63 μm) 反向填充材料 (德国 Merck 公司) 和 Sephadex LH-20 (瑞典 Amershan Pharmacia 公司); 薄层层析硅胶板 (GF₂₅₄) 和硅胶柱色谱填料 (200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); 提取分离所用石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇均为分析纯 (北京伊诺凯科技有限公司); 制备乙腈为色谱纯 (美国赛默飞世尔科技公司)。

实验所用药材均为 8~9 月采收自湖南永州, 经首都医科大学中医药学院王满元教授鉴定为黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 栽培品种的叶和小茎。凭证样本 (No. AA20201202) 保存于首都医科大学中医基础理论创新研究室。

1 提取分离

取干燥粉碎的青蒿 45 kg, 用 10 倍量的石油醚 40 °C 回流提取 3 次, 每次 1 h。合并提取液, 减压浓缩得到青蒿石油醚提取物 3.1 kg。取部分石油醚提取物 (1.8 kg) 加入 2% 氢氧化钠溶液萃取, 弃去氢氧化钠提取液, 将石油醚提取液水洗至中性, 脱水后浓缩得到青蒿石油醚中性部位 (1.17 kg)。将青蒿石油醚中性部位经 MCI 柱分离, 以不同浓度乙醇 (50%、70%、100%) 进行梯度洗脱, 得 3 个洗脱部位 MCI-50% (85 g)、MCI-70% (669 g)、MCI-100% (334 g)。MCI-70% (669 g) 采用硅胶柱色谱分离, 石油醚-乙酸乙酯 (100:0→0:1)

梯度洗脱, TLC 点板检测, 合并相同流分, 得到 6 个流分段 (Fr.A~F)。

Fr.C (94.5 g) 经过硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (100:0→1:1) 梯度分离得到 9 个亚组分 (Fr.C1~C9), Fr.C2 (8.8 g) 经反向 ODS 柱色谱分离, 用甲醇-水体系 (40%~100%) 梯度洗脱, 点板合并得到 24 个流分段 Fr.C2a~Fr.C2x。Fr.C2d 经二氯甲烷-正己烷重结晶得到化合物 **1** (20 mg)。Fr.C2a (1.03 g) 经半制备 HPLC 纯化 (乙腈-水, 70:30) 得到化合物 **3** (3.1 mg, $t_R = 12.0$ min)。Fr.C2e (3.3 g) 经硅胶柱色谱, 石油醚-乙酸乙酯 (40:1→1:1) 梯度洗脱得到 8 个流分段 Fr.C2e1~Fr.C2e8, Fr.C2e3 (0.7 g) 经半制备 HPLC 纯化 (乙腈-水, 50:50) 得到化合物 **4** (4.4 mg, $t_R = 10.0$ min)。Fr.E (56.6 g) 经过硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (100:0→1:1) 梯度分离得到 7 个亚组分 (Fr.E1~E7), Fr.E1 (3.0 g) 采用 Sephadex LH-20 凝胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 分离得到 20 个流分段 Fr.E1a~Fr.E1t。Fr.E1e 经石油醚-乙酸乙酯重结晶得到化合物 **2** (10.0 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **1** 无色块状结晶 (二氯甲烷-正己烷), mp 43~45 °C, $[\alpha]_D^{20} +102$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 201 (0.65) nm; IR ν_{max} : 2 936, 1 717, 1 377, 1 197 cm^{-1} 。 (+)-HR-ESI-MS m/z 269.176 2 $[M+H]^+$ (计算值为 269.175 3)。¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) 和 ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) 数据见表 1。

晶体参数: 分子式 C₁₅H₂₄O₄, $M = 268.34$, 斜方晶系, 晶胞参数为 $a = 8.796 5$ (4) nm, $b = 9.916 5$ (5) nm, $c = 16.788 1$ (9) nm, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $U = 1 464.452$ (13) Å³, $T = 180.00$ (10), 空间群为 P2₁2₁2₁ (no. 19), $Z = 4$, μ (Cu K α) = 0.705 mm⁻¹, 收集衍射点数为 27 956, 独立衍射点数为 2 807 ($R_{int} = 0.025 2$), wR_2 (F_2) 为 0.070 5, Flack 系数 -0.03 (4)。

化合物 **2** 白色无定形粉末, 易溶于甲醇, $[\alpha]_D^{20} +60$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 229 (0.43) nm, 200 (0.24) nm; IR ν_{max} : 2 933, 2 909, 2 849, 1 758, 1 734, 1 681 cm^{-1} 。 (+)-HR-ESI-MS m/z : 249.147 0 $[M+H]^+$ (计算值为 249.149 1), 分子式为 C₁₅H₂₀O₃。¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 0.94 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H₃-14), 1.12 (1H, tdd, $J = 13.5, 10.9, 3.1$ Hz, H-9a), 1.21 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H₃-13), 1.24 (2H, m, H₂-8), 1.56 (1H, dtd, $J = 17.6, 11.0, 6.6, 3.2$ Hz, H-10), 1.74 (1H, dq, $J = 13.3, 3.6$ Hz, H-9b), 1.81 (3H, d, $J = 1.5$ Hz, H₃-15), 1.85 (1H, m, H-1), 2.26 (1H, dt, $J = 11.3, 6.1$ Hz, H-7), 2.61 (1H, dd, $J = 17.4, 12.5$ Hz, H-2a), 2.71 (1H, dd, $J = 17.4, 4.4$ Hz, H-2b), 3.15 (1H, qd, $J = 7.1, 5.8$ Hz, H-11), 6.77 (1H, q,

$J = 1.5$ Hz, H-5); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 47.7 (C-1), 37.5 (C-2), 198.8 (C-3), 139.4 (C-4), 141.0 (C-5), 81.1 (C-6), 42.5 (C-7), 24.0 (C-8), 32.2 (C-9), 30.3 (C-10), 39.8 (C-11), 178.1 (C-12), 9.3 (C-13), 18.8 (C-14), 15.8 (C-15)。以上数据与文献^[15]报道基本一致, 故鉴定化合物为 3a, 4, 5, 6, 6a, 7-hexahydro-3, 6-dimethyl-9-methyl-2*H*-naphtho[8a, 1-*b*]furan-2, 8(3*H*)-dione。

化合物 3 无色油状物, 易溶于甲醇, (+)-HR-ESI-MS m/z : 223.171 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值为 223.169 8), 分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 0.94 (1H, dt, $J = 12.8, 7.2$ Hz, H-3a), 1.02 (6H, s, H_3 -13, 14), 1.31 (3H, s, H_3 -12), 1.44 (1H, m, H-6a), 1.54 (1H, m, H-2a), 1.66 (2H, m, H-2b, 10a), 1.94 (1H, m, H-1), 2.12 (2H, m, H-3b, 10b), 2.41 (1H, m, H-6b), 2.55 (2H, m, H_2 -7), 2.69 (1H, dd, $J = 9.9, 4.9$ Hz, H-5), 3.05 (1H, q, $J = 8.9$ Hz, H-9); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 51.5 (C-1), 26.6 (C-2), 39.2 (C-3), 59.1 (C-4), 61.8 (C-5), 24.9 (C-6), 37.9 (C-7), 214.3 (C-8), 52.8 (C-9), 35.5 (C-10), 34.7 (C-11), 16.4 (C-12), 29.5 (C-13), 22.4 (C-14)。以上数据与文献^[16]报道基本一致, 故鉴定化合物为 kobusone。

化合物 4 无色油状物, 易溶于甲醇, (+)-HR-ESI-MS m/z : 169.121 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值为 169.122 9), 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 1.00 (3H, s, H_3 -10), 1.06 (3H, s, H_3 -8), 1.29 (3H, s, H_3 -9), 1.55 (1H, ddd, $J = 13.1, 9.7, 4.0$ Hz, H-5a), 1.99 (1H, m, H-4), 2.02 (1H, m, H-6a), 2.07 (1H, m, H-5b), 2.19 (1H, td, $J = 9.5, 4.8$ Hz, H-6b), 2.41 (1H, dd, $J = 18.8, 1.6$ Hz, H-3a), 2.81 (1H, ddd, $J = 18.8, 5.1, 2.7$ Hz, H-3b); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 93 (C-1), 172 (C-2), 38.5 (C-3), 42.4 (C-4), 27.8 (C-5), 37 (C-6), 43.4 (C-7), 18.3 (C-8), 17.5 (C-9), 23.8 (C-10)。以上数据与文献^[17]报道基本一致, 故鉴定化合物为 1,2-campholide。

作者贡献: 邹道增负责成分分离、结构鉴定和文章撰写; 许福洁和袁继巧负责实验和写作指导、数据分析处理和论文修改; 王满元负责实验设计和课题管理, 论文框架构建。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

References

- Guo YH, Liu J, Liu CX, et al. Advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Artemisia annua* and prediction of quality markers [J]. Mod Tradit Chin Mater Med World Sci Technol (世界科学技术-中医药现代化), 2023, 25: 1309-1332.
- Han X, Chai Y, Lv C, et al. Sesquiterpenes from *Artemisia annua* and their cytotoxic activities [J]. Molecules, 2022, 27: 5079-5081.
- Abate G, Zhang L, Pucci M, et al. Phytochemical analysis and anti-inflammatory activity of different ethanolic phyto-extracts of *Artemisia annua* L. [J]. Biomolecules, 2021, 11: 975-995.
- Qin DP, Li HB, Pang QQ, et al. Structurally diverse sesquiterpenoids from the aerial parts of *Artemisia annua* (Qinghao) and their striking systemically anti-inflammatory activities [J]. Bioorg Chem, 2020, 103: 104221.
- Feng X, Cao S, Qiu F, et al. Traditional application and modern pharmacological research of *Artemisia annua* L. [J]. Pharmacol Ther, 2020, 216: 107650.
- Takenaka Y, Seki S, Nishi T, et al. Two new sesquiterpenes from *Artemisia annua* L. [J]. J Nat Med, 2020, 74: 811-818.
- Tu YY, Ni MY, Zhong YR, et al. Studies on the constituents of *Artemisia annua* L. [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 366-370.
- Brown GD. The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao) [J]. Molecules, 2010, 15: 7603-7698.
- Zhou YP, Zhao M, Zhou ZQ. State of the study on *Artemisia annua* resources [J]. Territ Nat Resour Study (国土与自然资源研究), 2006, 28: 93-94.
- Zhong GY, Zhou HR, Ling Y, et al. Investigation on ecological environment and quantitative analysis of artemisinin of sweet wormwood (*Artemisia annua*) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1998, 29: 264-267.
- Zhang XB, Guo LP, Huang LQ. Climate suitable rank distribution of artemisinin content of *Artemisia annua* in China [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 472-478.
- Zhang XB, Zhao YP, Huang XW, et al. Review on study of Dao-di herbs *Artemisiae annuae* Herba [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2016, 41: 2015-2018.
- Shi HN, Wang ZQ, Xu FJ, et al. A discovery-based metabolomic approach using UPLC-Q-TOF-MS/MS reveals potential antimalarial compounds present in *Artemisia annua* L. [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 14903.
- Brown GD, Liang GY, Sy LK. Terpenoids from the seeds of *Artemisia annua* [J]. Phytochemistry, 2003, 64: 303-323.
- Sy LK, Zhu NY, Brown GD. Syntheses of dihydroartemisinic acid and dihydro-*epi*-deoxyarteannuin B incorporating a stable isotope label at the 15-position for studies into the biosynthesis of artemisinin [J]. Tetrahedron, 2001, 57: 8495-8510.
- Chuang LF, Fan TY, Li JJ, et al. Kobusone: occurrence of a norsesquiterpenoid in the gorgonian coral *Rumphella antipathies* (Gorgoniidae) [J]. Biochem Syst Ecol, 2007, 35: 470-471.
- Hao XH, Yamazaki O, Yoshida A, et al. Green Baeyer-Villiger oxidation with hydrogen peroxide: $\text{Sn}[\text{N}(\text{SO}_2\text{C}_6\text{F}_5)_2]_4$ as a highly selective Lewis acid catalyst in a fluororous biphasic system [J]. Green Chem, 2003, 5: 524-528.